Tulips
University of Tsukuba Library

# Studies on pathfindings of the retinal axons under the influence of chondroitin sulfate in vitro

| | |
|---|---|
| 著者 | 安藤 覚 |
| 内容記述 | Thesis (Ph. D. in Behavioral Science)--University of Tsukuba, (B), no. 2508, 2010.4.30<br>Includes bibliographical references (leaves 36-45) |
| 発行年 | 2010 |
| その他のタイトル | コンドロイチン硫酸によるガイダンス調節を受ける網膜軸索の性質と行動 |
| URL | http://hdl.handle.net/2241/114634 |

【358】

| | |
|---|---|
| 氏　名（本籍） | 安藤　覚（福岡県） |
| 学位の種類 | 博　士（神経科学） |
| 学位記番号 | 博　乙　第　2508　号 |
| 学位授与年月日 | 平成22年4月30日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 審査研究科 | 人間総合科学研究科 |
| 学位論文題目 | **Studies on pathfindings of the retinal axons under the influence of chondroitin sulfate *in vitro***<br>（コンドロイチン硫酸によるガイダンス調節を受ける網膜軸索の性質と行動） |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 主　査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 志賀　隆 |
| 副　査 | 筑波大学准教授 | 医学博士、薬学博士 | 野上晴雄 |
| 副　査 | 筑波大学講師 | 博士（医学） | 尾崎　繁 |
| 副　査 | 筑波大学教授 | 博士（医学） | 桝　正幸 |

## 論文の内容の要旨

**（目的）**

発生過程において神経細胞から伸び出した軸索は、様々な調節を受けながら標的細胞へ投射し、神経回路を形成する。網膜視蓋投射では、網膜における神経細胞の地理的配置を保った回路が視蓋に形成されるため、神経回路網形成の研究に古くから用いられてきた。視索では軸索路を取り囲むように、高硫酸化されたコンドロイチン硫酸（CS）を持つコンドロイチン硫酸コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）が局在する。その際、軸索は伸長に抑制的な効果をもたらすと考えられるCSに接して走行するが、この軸索の性質は不明であった。一方、CSの構造多様性が軸索伸長の調節に関わり、網膜軸索はCSのガイダンス効果を感受すると考えられるが、CSが軸索伸長を調節する作用機序は明らかにされていない。そこで本研究では、CSを含む培養基質上における軸索の走行を解析する共に、CSが成長円錐の伸長を調節するか、またCSの構造多様性が成長円錐の行動の調節にどのように関わるかについて明らかにすることを目的とした。

**（対象と方法）**

(1) CS基質上の網膜軸索の走行

孵卵6日目のニワトリ胚の網膜外植片を、CSをスポット状にコートした基質上で培養し、基質を伸長する軸索について抗CS抗体染色によって検討した。その際、基質に結合する軸索が抗CS抗体の抗原へのアクセスを妨げる可能性が考えられるため、ビオチン化CSとストレプトアビジンの複合体をコートした基質を作製し、permeabilization処理して免疫染色を行った。また、固定前に軸索を基質から物理的に除去して免疫染色を行なった。さらに網膜細胞中に糖鎖の分解活性を持つ因子が含まれているかを検討するため、CSまたはヒアルロン酸を基質としたザイモグラフィーを行った。

(2) 成長円錐の動態に対するCSビーズの効果

ウシ血清アルブミンでブロッキング処理したポリスチレンビーズにCSを結合させ、培養基質上に静置した。そしてビーズに接する軸索成長円錐の動態をタイムラプス観察した。

**(結果)**

(1) CS 基質上の網膜軸索の走行

網膜外植片の培養では、CS スポットへの侵入を避ける軸索とスポット内に侵入する軸索が観察された。スポット内へ侵入した軸索に一致して基質における抗 CS 抗体染色の低下が観察された。permeabilization 処理を行っても軸索に一致した抗体染色の低下が観察された。また、軸索を基質から物理的に除去しても、軸索が走行した軌跡と考えられる抗 CS 抗体染色の低下が観察された。次に、CS またはヒアルロン酸を基質としたザイモグラフィーを行ったが、網膜ホモジェネート中からは CS 分解活性は検出されなかった。

(2) 成長円錐の動態に対する CS ビーズの効果

CS をコートしたビーズを培養基質上に静置し、ビーズに接する成長円錐の行動を観察した結果、成長円錐の反応から、①伸長方向を変えない "No change"、②伸長方向の変化を伴う "Turned"、③退縮を伴った "Retracted" の 3 種類に行動を分類した。ビーズに接する際の角度、つまりビーズへの接触の仕方と成長円錐の反応の間に相関はみられなかった。

**(考察)**

CS は軸索伸長を抑制する因子と考えられてきたが、本研究で、一部の軸索が CS 基質上を伸長することを示した。この軸索に一致して抗 CS 抗体染色の低下が観察され、その低下は permeabilization 処理や軸索の除去後も観察されたため、軸索が抗 CS 抗体染色の低下を引き起こしたと考えられる。以上より、網膜軸索は CS を改変するメカニズムを持つことが示唆された。一方、CS による軸索伸長の調節機構を解析する実験系は十分に確立されていなかった。CS をコートしたビーズの利用により、CS に接する成長円錐の反応について、培養基質との相互作用を考慮することなく検討できるようになった。その際、予めビーズをブロッキング処理すると、培地中に含まれる蛋白質との非特異的な影響を排除し、CS による特異的な効果が検討できる。以上より、培養基質に CS をコートする従来の実験系の弱点を克服し、軸索の伸長に及ぼす CS の直接効果を評価できる実験系が確立できた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

CSPG は軸索投射に抑制的に働くことが示されているが、その作用機序は不明である。本研究では、まず、スポットアッセイ法によって CS 上を伸長可能な網膜軸索が存在し、その軸索が CS を改変する可能性を示した。また、軸索先端の成長円錐と CS との直接相互作用を解析する培養法を確立した。この点で本論文は、神経回路形成における CS の機能解析の研究に貢献したと評価できる。

論文審査ならびに審議の結果、審査委員全員一致で合格と判定された。

よって、著者は博士（神経科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。